



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 277 698 A1

4(51) C 12 P 41/00
C 12 P 7/62

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C: 12 P / 322 708 4

(22) 06.12.88

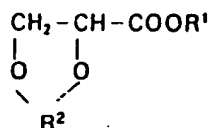
(44) 11.04.90

(71) VE Forschungszentrum Biotechnologie Berlin (PKG), Alt-Stralau 62, Berlin, 1017, DD
 (72) Knoll, Alexander, Dr. rer. nat., SU; Böhme, Monika, Dr. rer. nat., DD; Häfner, Barbara, Dr. rer. nat., DD; Szymanowski, Matthias, Dipl.-Chem., DD; Schrötter, Eberhard, Dr. rer. nat., DD; Schick, Hans-Georg, Prof. Dr. sc. nat., DD; Droscher, Peter, Dr. rer. nat., DD; Schönecker, Brunc, Dr. sc. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von substituierten (S)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureestern aus den Racematen

(55) (S)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureester, chiraler Baustein, Naturstoffsynthese, Pharmakasynthese, Kosmetikaherstellung, enzymatische Racemattrennung, proteolytische Enzyme, B. licheniformis 41 P (ZIMET 10911), Subtilisin DY, Thermoactinomyces vulgaris (ZIMET 9512 bzw. 9515)

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von (S)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureestern der allgemeinen Formel (-)-I in der R¹ einen Alkyl-, Aryl- oder substituierten Benzylrest und R² eine Methylene- oder Ethylengruppe, oder einen CR³R⁴-Rest, wobei R³ und R⁴ gleich oder verschieden Wasserstoff, Alkyl oder Aryl oder zusammen eine Tetra- oder Pentamethylenbrücke sein können, darstellt, die als universell verwendbarer chiraler Baustein, insbesondere für die Naturstoff- und Pharmakasynthese, beispielsweise Steroide [vgl. H. Takayama, S. Yamada, M. Ohmori EP 45.524(1982), C. A. 97(1982)39240; A. Furst, L. Labler, W. Meier EP 63.678(1982), C. A. 98(1982)198607], β -Blocker [vgl. J. J. Baldwin, A. W. Raab, K. Mensler, B. H. Arison, D. E. McClure J. Org. Chem. 43(1978)4876], oder als Zwischenprodukte für die Herstellung von Kosmetika [vgl. H. Moeller DE 3.447.783(1986), C. A. 105(1986)158625] geeignet sind. Erfindungsgemäß werden (S)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureester der allgemeinen Formel (-)-I

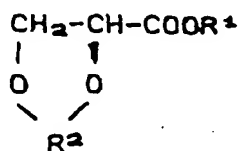


(-)-I

mit der für R¹ und R² erklärten Bedeutung dargestellt, indem racemischer 1,3-Dioxolan-4-carbonsäureester mit Hilfe proteolytischer Enzyme in seine Antipoden derart aufgetrennt wird, daß der (R)-1,3-Dioxolancarbonsäureester hydrolysiert wird und die Verbindung der allgemeinen Formel (-)-I isoliert werden kann. Als proteolytische Enzyme können bevorzugt alkalische Serinproteasen aus B. licheniformis 41 P (ZIMET 10911), Subtilisin DY und thermostabile Serinproteasen aus Thermoactinomyces vulgaris (ZIMET 9512 bzw. ZIMET 9515) verwendet werden.

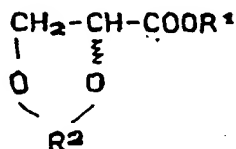
Patentanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von (S)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureestern der allgemeinen Formel (–)-I



(–)-I

in der R¹ einen Alkyl-, Aryl- oder substituierten Benzylrest und R² eine Methylen- oder Ethylengruppe, oder einen CR³R⁴-Rest, wobei R³ und R⁴ gleich oder verschieden Wasserstoff, Alkyl oder Aryl oder zusammen eine Tetra- oder Pentamethylenbrücke sein können, darstellt, **dadurch gekennzeichnet**, daß racemischer 1,3-Dioxolan-4-carbonsäureester der allgemeinen Formel (+/–)-I

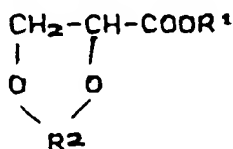


(+/–)-I

- mit der für R¹, R², R³ und R⁴ erklärten Bedeutung mit Hilfe proteolytischer Enzyme enantioselektiv derart in seine Antipoden aufgetrennt wird, daß der (R)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureester unter Zugabe von Basen, vorzugsweise Alkalihydroxyde, hydrolysiert wird und die erfindungsgemäße Verbindung der allgemeinen Formel (–)-I isoliert werden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Reaktion in einer Pufferlösung bei einem pH-Wert von 4–10, vorzugsweise von 7,0 bis 7,5, gegebenenfalls im Beisein eines organischen Lösungsmittels, bei einer Temperatur von 20 bis 90°C, vorzugsweise bei 25 bis 35°C durchgeführt wird.
 3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als proteolytische Enzyme alkalische Proteasen aus *Bacillus licheniformis* 41 P (ZIMET 10911), *Bacillus subtilis* und *Thermoactinomyces vulgaris* (ZIMET 9512 bzw. 9515), beispielsweise alkalische Serinprotease aus *B. licheniformis* 41 p, thermostabile Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris* oder Subtilisin DY, eingesetzt wird.
 4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß als organisches Lösungsmittel aliphatische C₁–C₄-Alkohole, Acetonitril, Dioxan, Aceton, Tetrahydrofuran, Nitromethan oder Dimethylformamid dem Puffergemisch zugesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von (S)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureestern der allgemeinen Formel (–)-I, in der R¹ ein Alkyl-, Aryl- oder substituierten Benzylrest und R² eine Methylen- oder Ethylengruppe, oder einen CR³R⁴-Rest, wobei R³ und R⁴ gleich oder verschieden Wasserstoff, Alkyl oder Aryl oder zusammen Tetra- oder Pentamethylenbrücke sein können, darstellt, die als universell verwendbar chiraler Baustein, insbesondere für die Naturstoff- und Pharmakasynthese, beispielsweise Steroide (vgl. H. Takayama, S. Yamada, M. Ohmori EP 45.524 [1982], C. A. 97 [1982] 39240; A. Furst, L. Labler, W. Meier EP 63.678 [1982], C. A. 98 [1982] 198607), β-Blocker (vgl. J. J. Baldwin, A. W. Raab, K. Mensler, B. H. Arison, D. E. McClure J. Org. Chem. 43 [1978] 4876), oder als Zwischenprodukte für die Herstellung von Kosmetika (vgl. H. Moeller DE 3.447.783 [1986], C. A. 105 [1986] 158625) geeignet sind.



BEST AVAILABLE COPY

(–)-I

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß enantiomerenreine (R)- oder (S)-1,3-Dioxolancarbonsäureester der allgemeinen Formel (+)- oder (–)-I durch Doazotierung und Ketalisierung von (R)- oder (S)-Serin herstellbar sind (E. Schrötter, A. Hauser, H. J. Hamann, H. Schick, B. Schönockor J. Prakt. Chem. 328 [1986] 705; C. M. Lok, J. P. Ward, D. A. Van Dorp Chem. Phys. Lipids 88 [1976] 115; R. Dumont, H. Pfander Helv. Chim. Acta 66 [1983] 814; J. Oelschläger, G. Gercken Lipids 13 [1978] 557; G. Hirth, W. Willy Helv. Chim. Acta 68 [1985] 1863). Weiterhin ist bekannt, daß D-Mannit und seine Derivate ebenfalls zu enantiomerenreinen 1,3-Dioxolan-4-carbonsäuren durch C–C-Spaltung umgewandelt werden können (R. Dumont, H. Pfander Helv. Chim. Acta 66 [1983] 814, J. Oelschläger, G. Gercken Lipids 13 [1978] 557, C. A. 89 [1978] 215681; J. J. Baldwin, A. W. Raab, K. Mensler, B. H. Arison, D. E. McClure J. Org. Chem. 43 [1978] 4876; G. Hirth, W. Willy Helv. Chim. Acta 68 [1985] 1863). Schließlich ist bekannt, daß die

enantiomerenreinen Verbindungen der allgemeinen Formel (+)- oder (-)-I durch Oxydation von Isopropylidenglycerin mit Kaliumpermanganat herstellbar sind (Y. Kawakami, T. Asai, K. Umeiyama, Y. Yamashita J. Org. Chem. 47 [1982] 3581). Dieses Verfahren zeichnet sich durch hohe Enantioselektivität aus, benötigen jedoch optisch reine Vorstufen und zum Teil toxische Reagenzien, wie z. B. Bleitetraacetat.

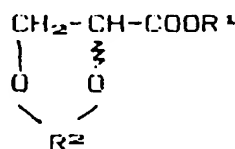
Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur enzymatischen Racemattrennung von 1,3-Dioxolan-4-carbonsäureestern mit hoher Enantiomerenreinheit und befriedigenden chemischen Ausbeuten zu entwickeln, bei dem keine toxischen Hilfsmittel und keine optisch aktiven Vorstufen benötigt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

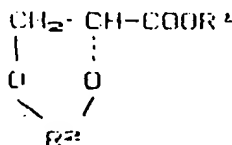
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein enzymatisches Verfahren zur Herstellung von (S)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureestern der allgemeinen Formel (-)-I zu entwickeln.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß ein racemischer 1,3-Dioxolan-4-carbonsäureester der allgemeinen Formel (+/-)-I



(+/-)-I

in der R¹ einen Alkyl-, Aryl- oder substituierten Benzylrest und R² eine Methylen- oder Ethylengruppe, oder einen CR³R⁴-Rest, wobei R³ und R⁴ gleich oder verschieden Wasserstoff, Alkyl oder Aryl oder zusammen eine Tetra- oder Pentamethylenbrücke sein können, darstellt, mit proteolytischen Enzymen, vorzugsweise Proteasen mikrobiellen und tierischen Ursprungs, beispielsweise Serinproteasen, in seine Antipoden aufgetrennt wird. Als proteolytische Enzyme können alkalische Proteasen aus *Bacillus licheniformis* 41P (ZIMET 10911), *Bacillus subtilis* und *Thermoactinomyces vulgaris* (ZIMET 9512 bzw. 9515), beispielsweise alkalische Serinprotease aus *B. licheniformis* 41 p, thermostabile Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris* oder Subtilisin DY, eingesetzt werden. Die erfindungsgemäße Reaktion verläuft in einer Pufferlösung, vorzugsweise in einem Phosphatpuffer, bei pH-Werten von 2 bis 10, vorzugsweise von 6 bis 7, gegebenenfalls im Beisein eines organischen Lösungsmittels und bei Temperaturen von 0 bis 90°C, bevorzugt bei 25 bis 35°C, derart, daß der (R)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureester der allgemeinen Formel (+)-I



(+)-I

durch Zusatz von Basen, vorzugsweise Alkalihydroxyde, hydrolysiert und der (S)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäureester der allgemeinen Formel (-)-I isoliert werden kann. Überraschenderweise gelingt es, die mit Schweinepankreaslipase (einem esterolytischen Enzym) nicht durchführbare Hydrolyse, mit Hilfe proteolytischer Enzyme in befriedigenden chemischen Ausbeuten und hoher Enantiomerenreinheit zu realisieren.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

363 mg (0,0023 mol) des racemischen 1,3-Dioxolan-4-carbonsäureesters der allgemeinen Formel (+/-)-I (R¹=CH₃; R²=CR³R⁴; R³=R⁴=CH₃) werden in 10 ml Phosphatpuffer (C = 0,01 M; pH = 7,01) suspendiert und bei 29°C inkubiert. Der Reaktionsmischung werden 20 mg alkalische Serinprotease aus *B. licheniformis* 41 P (ZIMET 10911) in Form einer dialysierten Ammoniumsulfatfällung zugegeben. Während der Reaktion wurde der pH bei 7,2 ± 0,1 mit einer 0,5 N Natronlauge konstant gehalten. Nach Verbrauch von 60% der zur Verseifung einer Estergruppe notwendigen Natronlauge wurde die Reaktion abgebrochen, die Reaktionsmischung 4mal mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und über einer Kieselsäure aufgetrennt. Es werden 121 mg (83%) (S)-(-)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäuremethylester der allgemeinen Formel (-)-I (R¹=CH₃; R²=CR³R⁴; R³=R⁴=CH₃) isoliert. [α]_D²⁰ = -14,8 (C = 4,85; CHCl₃), ee = 84,3%.

Beispiel 2

1,05 g (0,0066 mol) des racemischen 1,3-Dioxolan-4-carbonsäureesters der allgemeinen Formel (+/-)-I (R¹=CH₃; R²=CR³R⁴; R³=R⁴=CH₃) werden in 30 ml Phosphatpuffer (C = 0,01 M; pH = 7,01) suspendiert und bei 30°C inkubiert. Der Reaktionsmischung werden 15 mg alkalische Serinprotease aus *B. licheniformis* 41 P (ZIMET 10911) in Form einer dialysierten Ammoniumsulfatfällung zugegeben. Während der Reaktion wurde der pH bei 7,1 ± 0,1 mit einer 0,5 N-Natronlauge konstant gehalten. Nach Verbrauch von 60% der zur Verseifung einer Estergruppe notwendigen Natronlauge wurde die Reaktion abgebrochen, die Reaktionsmischung 4mal mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat

getrocknet, eingeeengt und über einer Kieselgelsäure aufgetrennt. Es werden 273 mg (65%) (S)-(-)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäuremethylester der allgemeinen Formel (-)-I ($R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CR}^3\text{R}^4$; $R^3 = \text{R}^4 = \text{CH}_3$) isoliert. $[\alpha]_D^{20} = -12,1$ (C = 2,73; CHCl_3), ee = 69,3%.

Beispiel 3

364,4 mg (0,0023 mol) des racemischen 1,3-Dioxolan-4-carbonsäureesters der allgemeinen Formel (+/-)-I ($R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CR}^3\text{R}^4$; $R^3 = \text{R}^4 = \text{CH}_3$) werden in 30 ml Phosphatpuffer (C = 0,01 M; pH = 7,01) suspendiert und bei 33°C inkubiert. Der Reaktionsmischung werden 113 mg thermostabile Serinprotease aus *Thermoactinomyces vulgaris* (ZIMET 9512 bzw. 9515) zugegeben. Während der Reaktion wurde der pH bei 7,1 ± 0,1 mit einer 0,5-N-Natronlauge konstant gehalten. Nach Verbrauch von 60% der zur Verseifung einer Estergruppe notwendigen Natronlauge wurde die Reaktion abgebrochen, die Reaktionsmischung 4mal mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und über einer Kieselgelsäure aufgetrennt. Es wurden 69,5 mg (48%) (S)-(-)-1,3-Dioxolan-4-carbonsäuremethylester der allgemeinen Formel (-)-I ($R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CR}^3\text{R}^4$; $R^3 = \text{R}^4 = \text{CH}_3$) isoliert. $[\alpha]_D^{20} = -15,1$ (C = 3,47; CHCl_3), ee = 86,7%.

Beispiel 4

357 mg (1,78 mmol) des racemischen 1,3-Dioxolan-4-carbonsäureesters der allgemeinen Formel (+/-)-I ($R^1 = \text{Methyl}$; $R^2 = \text{Cyclohexylden}$) werden in 8 ml Phosphatpuffer (pH = 7,01; C = 0,01) suspendiert, bei 33°C inkubiert und mit 9 mg alkalische Serinprotease aus *B. licheniformes* 41 P (ZIMET 10911) in Form einer dialysierten Ammonsulfatfällung versetzt. Während der Reaktion wurde der pH bei 7,5 ± 0,5 mit einer 0,5-N-Natronlauge konstant gehalten. Nach Verbrauch von 60% der zur Verseifung einer Estergruppe notwendigen Natronlauge wurde die Reaktion abgebrochen, die Reaktionsmischung 4mal mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und über einer Kieselgelsäule gereinigt. Es entstehen 131,8 mg (65,4%) des entsprechenden Esters der allgemeinen Formel (-)-I. $[\alpha]_D^{20} = -6,44$ (C = 10,14; CHCl_3), ee = 34%.

Beispiel 5

1,11 g (0,007 mol) des racemischen 1,3-Dioxolan-4-carbonsäureesters der allgemeinen Formel (+/-)-I ($R^1 = \text{CH}_3$; $R^2 = \text{CR}^3\text{R}^4$; $R^3 = \text{R}^4 = \text{CH}_3$) werden in 8 ml Phosphatpuffer (pH = 7,01; C = 0,01) und 3 ml Acetonitril suspendiert, bei 33°C inkubiert und mit 15 mg alkalische Serinprotease aus *B. licheniformes* 41 P (ZIMET 10911) in Form einer dialysierten Ammonsulfatfällung versetzt. Während der Reaktion wurde der pH bei 7,3 ± 0,1 mit einer 0,5-N-Natronlauge konstant gehalten. Nach Verbrauch von 60% der zur Verseifung einer Estergruppe notwendigen Natronlauge wurde die Reaktion abgebrochen, die Reaktionsmischung 4mal mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und über einer Kieselgelsäule gereinigt. Es entstehen 193 mg (44%) des entsprechenden Esters der allgemeinen Formel (-)-I. $[\alpha]_D^{20} = -11,0$ (C = 9,64; CHCl_3), ee = 63%.

BEST AVAILABLE COPY